

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶: B01L 7/00, 3/14, C12Q 1/68	A2	(11) International Publication Number: WO 95/11083 (43) International Publication Date: 27 April 1995 (27.04.95)
(21) International Application Number: PCT/US94/12125 (22) International Filing Date: 21 October 1994 (21.10.94) (30) Priority Data: 08/140,632 22 October 1993 (22.10.93) US (71) Applicant: ABBOTT LABORATORIES [US/US]; CHAD-0377/AP6D-2, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064-3500 (US). (72) Inventors: HANLEY, Kathleen, A.; 758 Greenview Street, Gurnee, IL 60031 (US). HOFFERBERT, A., David; 1710 Pleasant Valley Road, Grafton, WI 53024 (US). LEE, Helen, H.; 825 Morningside Drive, Lake Forest, IL 60045 (US). PEPE, Curtis, J.; 3609 Cornell Court, McHenry, IL 60050 (US). PERKO, Timothy, J.; 7017 Westmoreland Drive, St. Louis, MO 63130 (US). ZUREK, Thomas, F.; 752 Ashland, River Forest, IL 60305 (US). (74) Agents: BRAINARD, Thomas, D. et al.; Abbott Laboratories, CHAD 0377/AP6D-2, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064-3500 (US).		(81) Designated States: AU, CA, JP, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Published <i>Without international search report and to be republished upon receipt of that report.</i>
(54) Title: REACTION TUBE AND METHOD OF USE TO MINIMIZE CONTAMINATION		
(57) Abstract <p>A disposable reaction vessel for performing nucleic acid amplification assay. The disposable reaction vessel has a penetrable cap that can be penetrated by an automated pipettor to aspirate a portion of an amplified reaction product. The disposable reaction vessel contains the reagents necessary to perform a nucleic acid amplification assay. A patient specimen is added to the unit dose reagents in the disposable reaction vessel and the penetrable cap is closed. The disposable reaction vessel containing the reaction mixture and the specimen undergoes amplification, typically by placing it in a thermal cycler. After amplification the intact disposable reaction vessel is transferred to an automated analyzer where an automated pipettor penetrates the closure membrane and aspirates a portion of the amplified sample for further processing, without removal of the reaction vessel cap. This avoids the generation of potentially contaminating aerosols or droplets.</p> <div data-bbox="706 1113 1429 1848"> </div>		

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-50469C

日

(43) 公表日 平成9年(1997)5月1

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 Q 1/68		9453-4B	C 1 2 Q 1/68 A
B 0 1 L 3/00		9441-4D	B 0 1 L 3/00
	11/00	9441-4D	11/00
C 1 2 M 1/00		7417-4B	C 1 2 M 1/00 A
// C 1 2 N 15/09		0276-2 J	G 0 1 N 33/566

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 46 頁) 最終頁に続

(21) 出願番号 特願平7-512246
 (86) (22) 出願日 平成6年(1994)10月21日
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)4月22日
 (86) 国際出願番号 PCT/US94/12125
 (87) 国際公開番号 WO95/11083
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)4月27日
 (31) 優先権主張番号 08/140, 632
 (32) 優先日 1993年10月22日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP

(71) 出願人 アボット・ラボラトリーズ
 アメリカ合衆国、イリノイ・60064-3500
 アボット・パーク、アボット・パーク・
 ード・100、チャド・0377/エイ・ビー・
 6・デー2
 (72) 発明者 ハンリー、キャスリーン・エー
 アメリカ合衆国、イリノイ・60031、ガー
 ニー、グリーンビュー・ストリート・751
 (72) 発明者 ホフアーバート、エー・デビッド
 アメリカ合衆国、ウイスコンシン・5302、
 グラフトン、プレザント・バレー・ロー
 ド・1710
 (74) 代理人 弁理士 川口 義雄 (外3名)

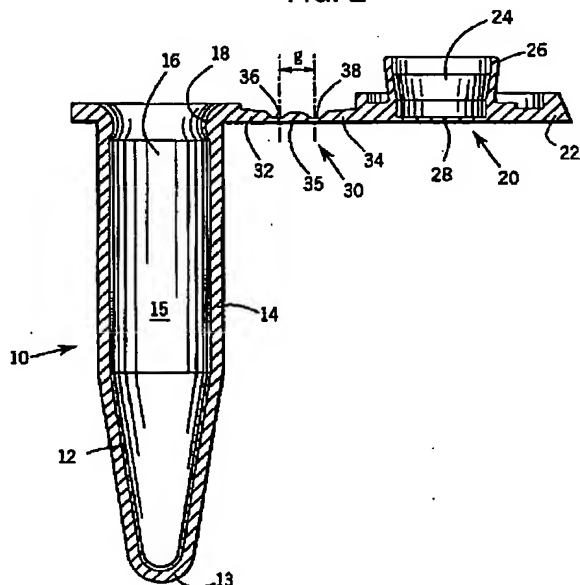
最終頁に続

(54) 【発明の名称】 汚染を最小限にするための反応チューブおよび使用方法

(57) 【要約】

核酸増幅アッセイを行うための使い捨て反応チューブ。
 使い捨て反応容器は、自動ピペッターによって貫通し、
 増幅反応生成物の一部を吸引することができる貫通可能
 なキャップを有する。使い捨て反応容器は、核酸増幅ア
 ッセイを行うのに必要な試薬を含む。患者の試料を、使
 い捨て反応容器中の単位用量試薬に添加し、貫通可能な
 キャップを閉じる。反応混合物および試料を含む使い捨
 て反応容器は、典型的には熱サイ클ーに置くことによ
 って増幅を受ける。増幅後、使い捨て反応容器をそのま
 ま自動分析機に移す。そこでは、反応容器のキャップを
 取り除くことなく、自動ピペッターが閉じた膜を貫通し、
 さらに処理するために増幅サンプルの一部を吸引す
 る。こうすることにより、汚染の可能性のあるエアロゾ
 ルまたは飛沫の発生が避けられる。

FIG. 2



【特許請求の範囲】

1. 核酸物質の増幅及び検出方法であって、下記工程：

a. 標的の核酸物質を含むことが疑われるサンプルを、その疑わしい標的核酸を増幅するために、標識した試薬とともに増幅容器に添加して反応混合物を形成する工程；

b. 該容器内の反応混合物を、ピペッタープローブによって貫通可能な膜を有するぴったり密閉したキャップを閉じることにより密閉する工程；

c. 該容器内の標的核酸物質を増幅する工程；

d. 反応混合物の一部を該容器から検出用に取り出す工程；および

e. 標識した試薬を検出することによって増幅した標的核酸の存在を検出する工程

を含み、取り出す工程が、該キャップ膜をピペッタープローブで突き刺し、該反応混合物の一部を該ピペッターに吸引して、該一部を該容器のキャップを取ることなく別個の検出室に分配することにより行われ、それによって、環境、未反応サンプルもしくは試薬を汚染する可能性のある増幅された物質の飛沫ま

たはエアロゾルを回避する、核酸物質の増幅及び検出方法。

2. さらに、容器および検出室に残っている全核酸物質を、ピペッターから核酸不活性化試薬を該容器および検出室に分配することにより不活性化する工程を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

3. 不活性化が銅フェナントロリンキレートおよび過酸化水素溶液の連続添加を含むことを特徴とする請求項2に記載の方法。

4. 反応容器が、厚さ0.002～0.015インチの膜を有するキャップのついたチューブであることを特徴とする請求項1に記載の方法。

5. 反応容器が、厚さ0.005～0.009インチの膜を有するキャップのついたチューブであることを特徴とする請求項4に記載の方法。

6. ピペッティングプローブが、鑿形の先端を有する細い金属チューブであることを特徴とする請求項1に記載の方法。

7. 該プローブの外径が0.050インチ以下であることを特徴とする請求項6に記

載の方法。

8. 増幅工程がポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

9. 増幅工程がリガーゼ連鎖反応 (LCR) を含むことを特徴とする請求項1に記載

載の方法。

10. さらに、自動検出するために、密閉した増幅容器を自動ピペッタープローブ装置に置く工程を含み、該置く工程が工程dの取り出し工程の前であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

11. 取り出し工程および検出工程が共に自動装置によって行われることを特徴とする請求項11に記載の方法。

12. さらに、容器および検出室に残っている全核酸物質を、核酸不活性化試薬を該容器および検出室に分配することによって不活性化する工程を含み、前記取り出す工程、検出工程および不活性化工程は全て、自動ピペッター装置によって行うことを特徴とする請求項10に記載の方法。

13. 核酸配列を増幅するためのキットであって、

a) 本質的に、

- 各々、1.6nM以上存在する、所望の標的核酸をPCRによって増幅するための一組以上のオリゴヌクレオチドプライマー；
- 1.0 μ M以上存在する、デオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTPs) の補給；
- 熱安定性ポリメラーゼ活性を有する試薬；

-所望により、界面活性剤および不活性担体核酸；ならびに

-ポリメラーゼ活性の効果をなくすのに十分低い濃度のMg²⁺イオンから成る、一つの容器におけるPCR増幅組成物；および

b) Mg²⁺イオンを、サンプルの希釈および希釈サンプルとキット取扱説明書に従う増幅組成物との混合により、混合物中にポリメラーゼ活性の活性化に十分な最終濃度のMg²⁺イオンが得られるような濃度で含む、第二の容器におけるサン

ブル処理溶液

を含むキット。

14. プライマーの濃度が1.6nM~160nMであり、dNTPsの濃度が1.0~200 μ Mであることを特徴とする請求項13に記載のキット。

15. 熱安定性ポリメラーゼ活性を有する試薬が、*Thermus*種微生物由来のポリメラーゼ酵素であることを特徴とする請求項13に記載のキット。

16. 熱安定性ポリメラーゼ活性を有する試薬が、*Thermus*種微生物由来のポリメラーゼ酵素であることを特徴とする請求項14に記載のキット。

17. 前記PCR増幅組成物中のMg²⁺イオンの濃度が約10⁻⁴M以下であり、前記混合物におけるMg²⁺イオンの最終濃度が1~40nMであることを特徴とする請求項13に記載のキット。

18. 核酸配列を増幅するためのキットであって、

a) 本質的に、

—各々、約1.6nM以上存在する、所望の標的核酸をLCRまたはGLCRによって増幅するための少なくとも二対の相補的オリゴヌクレオチドプローブ；

—熱安定性リガーゼ活性を有する試薬；

—所望により、1.0 μ M以上で存在する、全4種類より少ないデオキシヌクレオチド三リン酸（dNTPs）の補給および熱安定性ポリメラーゼ活性を有する試薬；

—所望により、界面活性剤および不活性担体核酸；ならびに

—リガーゼ活性の効果をなくするのに十分低い濃度のMg²⁺イオンから成るLCR増幅組成物；および

b) Mg²⁺イオンを、サンプルの希釈および希釈サンプルとキット取扱説明書に従う増幅組成物との混合により、混合物中に

リガーゼ活性の活性化に十分な最終濃度のMg²⁺イオンが得られるような濃度で含む、第二の容器におけるサンプル処理溶液を含むキット。

19. プローブの濃度が1.6nM~160nMであることを特徴とする請求項18に記載

のキット。

20. 熱安定性リガーゼ活性を有する試薬が、*Thermus*種微生物由来のリガーゼ酵素であることを特徴とする請求項18に記載のキット。

21. 熱安定性リガーゼ活性を有する試薬が、*Thermus*種微生物由来のリガーゼ酵素であることを特徴とする請求項19に記載のキット。

22. 前記LCR増幅組成物中の Mg^{2+} イオンの濃度が約 $10^{-4}M$ 以下であり、前記混合物における Mg^{2+} イオンの最終濃度が1~40mMであることを特徴とする請求項18に記載のキット。

23. dNTPsおよび熱安定性ポリメラーゼ活性を有する試薬が存在し、LCR増幅組成物中の Mg^{2+} イオンの濃度が、該ポリメラーゼ活性の効果をなくするのに十分低いことを特徴とするGLCR用の請求項18に記載のキット。

24. Mg^{2+} イオンの濃度が、約 $10^{-4}M$ 以下であることを特徴とする請求項23に記載のキット。

25. 核酸増幅アッセイを行うための反応容器装置であって、
一外径が熱サイクル装置に適合する大きさであり、内部に対して開口部を有する熱安定性ポリマー材料のチューブ；
一厚さが0.0015インチ以下の穴をあけることができる膜を含み、その膜によって、チューブを開けることなく自動ピペッターで閉じたチューブから増幅反応生成物のサンプルを採取することができる、チューブの開口部をぴったり密閉するためのキャップ；および一キャップをチューブに対して保持し、キャップを開口部の中に折り畳むことができる軟質蝶番を含む、反応容器装置。

26. 穴をあけることができる膜の厚さが、0.002~0.015インチであることを特徴とする請求項25に記載の反応容器。

27. 穴をあけることができる膜の厚さが、0.005~0.009インチであることを特徴とする請求項26に記載の反応容器。

28. 穴をあけることができる膜の厚さが、 0.005 ± 0.001 インチであることを特徴とする請求項26に記載の反応容器。

29. 核酸増幅アッセイを行うための反応容器装置であって、

—外径が熱サイクル装置に適合する大きさであり、内部に対して開口部を有する熱安定性ポリマー材料のチューブ；

—穴をあけることができる薄い膜を含み、その膜によって、チューブを開けることなく自動ピペッターで閉じたチューブから増幅反応生成物のサンプルを採取することができる、チューブの開口部をぴったり密閉するためのキャップ；および

—キャップをチューブに対して保持し、キャップを開口部の中に折り畳むことができ、折り畳み蝶番を含む軟質蝶番を含む、反応容器装置。

30. 穴をあけることができる膜の厚さが、0.002～0.015インチであることを特徴とする請求項29に記載の反応容器。

31. 穴をあけることができる膜の厚さが、0.005～0.009インチであることを特徴とする請求項30に記載の反応容器。

32. 穴をあけることができる膜の厚さが、 0.005 ± 0.001 インチであることを特徴とする請求項30に記載の反応容器。

33. 蝶番が閉じたチューブの最大半径を規定し、チューブの外径から該最大半径までの距離は約0.154インチ未満であることを特徴とする請求項29に記載の反応容器。

34. 折り畳み蝶番が、さらに、蝶番材料に刻まれた2つの溝

を含み、 g/h の比が約 $0.8 \pm 20\%$ であり、 g は二つの溝の中央線間の距離であり、 h は、キャップが密閉位置にあるときに測定したチューブへの付着点からキャップの上部までの蝶番部品全体の高さであることを特徴とする請求項29に記載の反応容器。

35. g が2～2.5mmであることを特徴とする請求項34に記載の反応容器。

【発明の詳細な説明】汚染を最小限にするための反応チューブおよび使用方法**発明の詳細な説明**

本発明は、増幅反応に適する反応チューブ、特に、自動熱サイクルおよび検出装置で使用するためのチューブに関する。本発明はまた、該チューブの自動的使用方法に関する。

本出願は、本出願人による米国出願No.08/141,243 (1993年10月22日出願) 「チューブ輸送システムおよび使用方法」 (代理人名簿5453.US.01) (現在は放棄) に関する。

発明の背景

生物学的サンプル中の標的核酸を検出するための増幅技術は、感染性のある微生物および遺伝子欠陥の検出に対して高い感度および特異性を提供する。核酸の特定の配列のコピーは、増幅法によって指数関数的速度で合成される。これらの技術の例としては、ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR) (米国特許No.4,683,202およびNo.4,683,195(Mullis)) ; リガーゼ連鎖反応法(LCR) (EP-A-320308(Backmanら)) ; ならびにギャップフィリングLCR法(GLCR) またはその変法(WO 90/01069(Segev)、EP-A-439-182 (Backmanら)、GB 2,225,112A

(Newtonら)およびWO 93/00447(Birkenmeyerら))がある。

他の増幅技術としては、文献に記載のQ- β レプリカーゼ法; EP-A-497272(Walker)、EP-A-500224(Walkerら)およびWalkerら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89:392(1992)に記載のStrand Displacement Amplification法(SDA); Fahyら、PCR Methods and Applications 1:25(1991)に記載のSelf-Sustained Sequence Replication法(3SR); ならびにkievitsら、J. Virol. Methods, 35:273-286(1991)に記載のNucleic Acid Sequence-Based Amplification法(NASBA)が挙げられる。

これらの反応、特に熱サイクルを必要とする反応は、通常、National Scientific(San Rafael, CA)製のSlickSeal (登録商標) チューブなどのマイクロフュージ(microfuge)型チューブまたはPerkin-Elmer(Norwalk, CT)製のThin-Walled GeneAmp (登録商標) チューブで行われる。別の型の反応容器は、EP-A-488769に記

載され、Perkin-Elmer(Norwalk, CT)から、Perkin-Elmer 9600熱サイクラーとともに使用するためのMicroAmp (登録商標) として市販されている、ストリップ状の半球形キャップと結合したストリップ状のマイクロフュージ反

応容器である。典型的な方法では、増幅反応を行った後、チューブを開けて、増幅反応生成物の一部をマイクロタイタープレート、ゲルまたは他の検出装置などの検出装置に移す。

そのような核酸増幅方法に伴う主な問題は、増幅容器を開けるときの汚染の危険である。増幅反応生成物の一部を取り出して検出分析を行うためにキャップを取り除くときに、こぼしたり、飛沫が生成したり、および／またはエアロゾルが発生する可能性がある。これは、飛沫が空気中で運ばれることにより実験室中に、または装置上に増幅産物を撒き散らしたり、未増幅サンプルおよび／または試薬を汚染する可能性がある。これは、すぐに、擬陽性(false positive results)の結果を招くことになる。そのような汚染を防ぐためには、極度の注意を払わなければならない。その分野では、習慣的に、サンプル調製、増幅および検出領域の間を物理的に分離している。それは、かなり複雑で費用もかかり、そのような隔離した領域間での実験室用の上着、手袋、ピペットまたは実験室装置の移動を防ぐための厳しい訓練が必要である。

USP 5,229,297および対応のEP-A-0381501 (Kodak) は、閉じた環境で核酸物質の増幅および検出を行って汚染の危険を防

ぐためのキュベットを開示している。そのキュベットは、一連の通路によって連結している複数の部屋(compartment)を有する閉じた装置である。部屋のいくつかはDNA鎖を増幅するための反応室であり、いくつかは増幅されたDNAを検出するための検出位置を有する検出室である。試薬を保持するための貯蔵室を備えることもできる。核酸物質のサンプルを貯蔵室の試薬とともに通路を経由して反応室に入れる。貯蔵室から出る通路には、増幅した物質が貯蔵室に逆流するのを防ぐための一方向逆止め弁を備えている。サンプルを反応室で増幅し、増幅産物を反応室から通路を通して検出室に押し入れるために軟質壁に外圧をかけるこ

とにより、相互連絡している通路を通して検出室の検出位置に移す。あるいは、反応室から検出室へ試薬および／または増幅産物をポンプで送るためのピストン装置をキュベットに備えてもよい。

EP 0381501 A2 (kodak) に開示されたキュベットは、閉じた反応および検出環境を提供するものであるが、いくつかの重要な欠点がある。例えば、多重室、多重通路、逆止め弁およびポンプ機構は比較的複雑な構造であって、製造するのにかなりの努力を要する。また、EP 0381501 A2に開示されたキュベット

の形および立体配置は、従来の熱サイクル装置に容易に挿入できるものではない。さらに、そのキュベットが利用する流体移動法は、軟質側壁に適用されるローラー装置または小さいピストンの移動などの機械的外圧源を必要とする。通常の熱サイクル装置は、そのような外圧源を含むように容易に改造されるものではなく、又、軟質壁にかかる機械的圧力は、特にキュベットが一行に並んでいない場合は、これらの壁を破裂させる可能性がある。増幅反応生成物を含む外部室の軟質壁の破裂は、装置内部、そして恐らくは実験室全体を汚染するであろう。最後に、この文献に記載された装置は、開示された装置のスループットの点でかなり制限される。そのシステムは、製造のための所望の柔軟性を提供するものではない。

フランス特許公開No.FR 2672301 (Larzul) は、DNA増幅のための、同様に密閉されたテスト装置を開示している。それはまた、多重室および通路を有し、サンプルおよび／または試薬はその通路を経由して移動する。流体輸送のための原動力は、水圧変位、磁気変位、受動型毛細管作用、熱勾配、蠕動性ポンプおよび機械的に誘発される圧力差動（例えば、押し出し）として記載されている。

この分野で、汚染の問題の処理に適用される他の方法は化学的である。そのような方法の一つは、USP 5,035,996(Hartley,Life Technologies, Inc.)に記載されている。それは、増幅産物に、分析すべきサンプルに一般には存在しないリボヌクレオシド三リン酸 (r N T P) またはデオキシリボヌクレオシド三リン酸 (d N T P) 塩基（例えば、DNA分析の場合は、d U T P) を混入させることを

含む。こうして、増幅産物は、多重位置にウラシルを有する配列を有することになる。ウラシルDNAグリコシラーゼ(UDG)酵素を増幅の前にサンプルに添加する。こうすると、サンプル中の天然DNAに影響を及ぼすことなく汚染反応生成物(ウラシルを含む)が消化される。

この方法は、PCR法には作用するが、LCR法に対しては、能力が制限される。それは、平滑末端LCR法には適用できないし、ギャップLCR法に対しては能力が非常に制限される。ギャップLCR法の場合、ギャップを満たすために2、3個より多くのウラシル塩基を入れることは実際的でない。UDGの作用は、PCR増幅では多数の部位で働くのに対して、一つの部位でのみ働く。この方法は、Roche Diagnosticsにより、Amplicor(登録商標)DNA増幅アッセイの不活性化法として

市販されているが、種々の増幅反応に適用することはできない。

汚染の危険を最小限にするために使用される他の方法として、検出反応完了後に、増幅反応生成物およびポリヌクレオチド試薬を破壊する方法がある。該方法は、本出願人による審査中の米国特許出願07/863,662(Celebuski)「ヌクレオチド配列を不活性化するための方法およびその方法で使用するための金属キレート」(1992年4月3日出願)に記載されている。その不活化法は、反応生成物および、所望により全装置に添加される銅フェナントロリン錯体などの二価の金属キレートおよび過酸化水素の希水溶液を利用するものである。この組成物は、全DNAを増幅できない小さい断片に切断するのに非常に有効である。従って、増幅の前よりもむしろ増幅産物の検出後に使用される。UDGおよび金属キレートなどの化学的方法は、少量の汚染防止に有効であるが、反応生成物の小滴の様なより大きい汚染の場合にはあまり十分ではない。すなわち、閉じた系で増幅反応を行うことの必要性は、EP 0381501 A2、EP 0550090 A1およびUS 5,229,297などの文献で認識されている。これらの文献は、そのような閉じた反応の使い捨て用品を記載している。

さらに、PCT公開WO 91/12342(Cetus)は、マグネシウムなどの種々の成分が分

離されるPCR反応組成物を開示している。例えば、一つの態様では、マグネシウムを、油性または蠟質層によって他の反応成分から分離し、別の態様では、マグネシウム（ステアリン酸脂肪酸塩など）が蠟質バリア層の成分である。いずれの場合も、分離した成分は、反応混合物を加熱して標的核酸を解離するとき、またはPCRを開始するときに結合して、蠟は溶融する。しかし、この系は、特に自動化されたピペッティングを必要とする場合に、自動化の助けとはならない。検出のために冷却すると、蠟は再び凝固して、ピペットの先端を塞ぐ可能性がある。蠟はまた、自動化検出システムでは通常使用される液体レベル感知検出系を妨げる。これらの理由により、最初に分離した試薬（例えば、マグネシウム）を結合するための改善された組成物および結合方法が所望される。

特に上記または下記で挙げた特許、特許出願および文献の各々は、参考文献として本明細書に添付する。

すなわち、先行技術のこれらの制限により、汚染の危険を最小限にする増幅反応容器および使用方法を求めることが本発明の重要な目的である。さらに別の目的は、増幅反応サンプルを、

密封キャップを取り除くことなく除去することができる使い捨ての反応容器および方法を提供することである。なぜならば、キャップの取り外しはエアロゾル汚染を撒き散らす傾向があるからである。本発明のさらに別の目的は、増幅反応サンプルを、容器の密封の妨害を最小限にして取り出すことができる密閉使い捨て反応容器および方法を提供することである。

本発明の別の目的は、ここに記載したような反応容器の単位用量調製物、特に自動化ピペットを使用する自動検出装置と適合する単位用量容器に適する組成物を提供することである。

本発明のさらに別の目的は、市販の熱サイクル、例えばPerkin-Elmer 480、および微粒子酵素イムノアッセイ（Microparticle Enzyme Immuno Assay: MEIA）法を使用する装置などの自動検出装置とすぐに適合する反応容器を提供することである。

これらおよび他の目的は、下記に記載する本発明で満たされる。

本発明の要旨

第一の態様において、本発明は、下記工程：

a. 標的の核酸物質を含むことが疑われるサンプルを、その疑

わしい標的核酸を増幅するために、標識試薬とともに増幅容器に添加して反応混合物を形成する工程；

b. 該容器内の反応混合物を、ピペッタープローブ(pipettor probe)によって貫通可能な膜を有するぴったり密閉するキャップを閉じることにより密閉する工程；

c. 該容器内の標的核酸物質を増幅する工程；

d. 反応混合物の一部を該容器から検出用に取り出す工程；および

e. 前記標識試薬を検出することによって増幅した標的核酸の有無を検出する工程

を含み、前記取り出す工程が、該キャップ膜をピペッタープローブで突き刺し、反応混合物の該一部を該ピペッターに吸引して、該一部を該容器のキャップを取ることなく別個の検出室に分配することにより行われ、それによって、環境、未反応サンプルもしくは試薬を汚染する可能性のある増幅された物質の飛沫またはエアロゾルを回避する、核酸物質を増幅して検出するための方法に関する。

増幅法は、PCRまたはLCRまたは別の増幅法であってもよい。

その方法は、好ましくは、さらに、容器および検出室に残っている全核酸物質を、ピペッターから核酸不活性化試薬を分配することにより不活性化する工程を含む。不活性化は、銅フェナントロリンキレートおよび過酸化水素溶液の連続添加を含むことができる。

好ましくは反応容器は、厚さが0.002～0.015インチ、より好ましくは0.005～0.009インチの範囲である膜を有するキャップのついたチューブである。

ピペッティングプローブは、好ましくは外径が0.050インチ以下である楔形または鑿形の先端を有する薄い金属チューブであってもよい。

典型的には、密閉した増幅容器は、自動検出のための自動ピペッタープローブ

装置で使用し、取り出す工程および検出工程は共に、自動装置によって行われる。より好ましくは、その方法はさらに、容器および検出室に残っている全核酸物質を不活性化する工程を含み、取り出す工程、検出工程および不活性化工程は全て、自動ピペッター装置によって行う。

第二の態様では、本発明は、マグネシウムイオンを省いたPCRまたはLCR増幅反応用の安定した組成物を、マグネシ

ウムの補助源とともに含むキットに関する。組成物は、典型的には、単位用量反応容器を満たすように使用する。すなわち、増幅組成物は、増幅に必要な全反応物をマグネシウム補助因子を除いて含み、第二のサンプル調製組成物はマグネシウムを含む。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅するための単位用量反応容器を調製するための組成物は、本質的に、

- 各々、1.6nM以上、好ましくは1.6nM~160nMで存在する、所望の標的核酸をPCRによって増幅するための少なくとも一組のオリゴヌクレオチドプライマー；
 - 1.0 μ M以上、好ましくは1.0~200 μ Mで存在する、デオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)の補給；
 - 熱安定性ポリメラーゼ活性を有する試薬、好ましくはThermus種微生物由来のポリメラーゼ酵素；
 - 所望により、界面活性剤および不活性担体核酸；ならびに
 - ポリメラーゼ活性の効果をなくするのに十分低い濃度、好ましくは 10^{-4} M以下の濃度のMg²⁺イオン
- から成る。

リガーゼ連鎖反応(LCR)又はギャップリガーゼ連鎖反応(GLCR)による増幅用の単位用量反応容器を調製するための別の

組成物は、本質的に、

- 各々、約1.6nM以上、好ましくは1.6nM~16nMで存在する、所望の標的核酸をLCRまたはGLCRによって増幅するための少なくとも二組の相補的オリゴヌクレオチドプローブ；

ー熱安定性リガーゼ活性を有する試薬、好ましくはThermus種微生物由来のリガーゼ酵素；
ー所望により、 $1.0\mu\text{M}$ 以上で存在する、全4種類より少ないデオキシヌクレオチド三リン酸（dNTP）の補給および熱安定性ポリメラーゼ活性を有する試薬、好ましくはThermus種ポリメラーゼ酵素由来の試薬；
ー所望により、界面活性剤および不活性担体核酸；ならびに
ーリガーゼ活性の効果をなくすのに十分低い濃度、好ましくは 10^{-4}M 以下の濃度の Mg^{2+} イオンから成る。

最も好ましくは、組成物が、ギャップPCRを行うためのdNTPおよび熱安定性ポリメラーゼ活性を有する試薬を含む。いずれの場合も、マグネシウムの補助的供給は、組成物外の源に由来する。好ましくは、マグネシウムは、キットに含まれるサンプル希釈剤または緩衝液中に、希釈された適容量のサン

ブルの添加が、必要なマグネシウム補助因子を、約 1mM ～約 40mM の最終濃度で供給するのに十分な濃度で存在する。

最後の態様では、本発明は、以下の通り、増幅反応で使用するための密閉可能な使い捨て装置に関する。

すなわち、

ー外径が熱サイクル装置に適合する大きさであり、内部に対して開口部を有する熱安定性ポリマー物質のチューブ；
ー厚さが 0.0015 インチ以下の穴がかけられる膜を含み、その膜によって、チューブを開けることなく自動ピペッターで閉じたチューブから増幅反応生成物のサンプルを採取することができる、チューブの開口部をぴったり密閉するためのキャップ；およびーキャップをチューブに対して保持し、キャップを開口部の中に折り畳むことができる軟質蝶番を含む、核酸増幅アッセイを行うための反応容器装置である。
好ましくは、穴がかけられる膜の厚さは、 $0.002\sim 0.015$ インチ、特に、 $0.005\sim 0.009$ インチである。

ー外径が熱サイクル装置に適合する大きさであり、内部に対して開口部を有する熱安定性ポリマー物質のチューブ；

ー穴がかけられる薄い膜を含み、その膜によって、チューブを

開けることなく自動ピッペッターで閉じたチューブから増幅反応生成物のサンプルを採取することができる、チューブの開口部をぴったり密閉するためのキャップ；および

ーキャップをチューブに対して保持し、キャップを開口部の中に折り畳むことができ、折り畳み蝶番を含む軟質蝶番を含む、核酸増幅アッセイを行うための反応容器装置である。

好ましくは、穴がかけられる膜の厚さが、0.002～0.015インチ、特に、0.005～0.009インチである。

反応容器は、閉じたチューブの最大半径を規定する蝶番を有し、チューブの外径から最大半径までの距離は約0.154インチ未満である。所望により、折り畳み蝶番は、さらに、蝶番の材料に2個の溝を含み、 g/h の比は約 $0.8 \pm 20\%$ である。 g は二つの溝の中央線間の距離であって、好ましくは2～2.5mmであり、 h は、ふたが密閉位置にあるときに測定したチューブへの付着点からふたの上部までの蝶番部品全体の高さである。

図面の簡単な説明

図1は、フリップキャップが開いている、先行技術のSlickSeal（登録商標）使い捨て反応容器の縦断面図である。

図2は、本発明に係る使い捨て反応容器の縦断面図である。

フリップキャップは開いており、図3の線a-a'に沿って切断した断面を示す。

図3は、図2の反応容器の平面図である。

図4は、図2および3の反応容器の側面図である。

図5は、図1（上）および図2（下）の反応容器の複合部分断面図であり、共に、蝶番構造を説明するために、フリップキャップを閉じた位置にして示す。

図6は、図2の反応容器の側面図、特に、はっきり示すために部分的に切断した断面図であり、蝶番式のキャップは部分的に閉じた位置にある。

図7は、自動検出装置で使用するための、図2の反応容器を保持するように作られた反応容器ホルダーの上から見た斜視図である。

図8は、実施例6の結果のグラフである。

発明の詳細な説明

本発明は、核酸増幅アッセイを行うための使い捨て反応容器である。使い捨て反応容器は貫通できるキャップを有し、そのキャップは、自動ピペッターで貫通して、増幅反応生成物の一部を吸引することができる。使い捨て反応容器は、リガーゼ連

鎖反応(LCR)またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)などの核酸増幅アッセイを行うのに必要な試薬を含む。患者の試料を使い捨て反応容器中の単位用量試薬に添加して、貫通可能なキャップを閉じる。反応混合物および試料を含む使い捨て反応容器は、典型的にはそれを熱サイクラーに置くことによって、増幅を行う。増幅後、使い捨て反応容器をそのまま、自動分析機に移す。そこでは、反応容器のキャップを取り除くことなく、自動ピペッターが閉じた膜を貫通し、さらに処理するために増幅されたサンプルの一部を吸引する。こうすることにより、汚染の可能性のあるエロゾルおよび飛沫の発生が回避される。

1. 定義

「増幅反応」は、元の核酸の配列の多数のコピーを、典型的には酵素による複製工程を多数回繰り返すことにより生じさせる反応である。その前のサイクルで作られた2つのコピーの各々から別のコピーを作ることができる場合、その増幅法は、サイクル数に関して指数関数的であると言う。アッセイ感度の改善には指数関数的増幅が好ましいけれども、増幅産物が注意深く封じ込めることができないで、その結果汚染を招く場合は、この感度の増大は欠点でもある。汚染およびいくつかの増幅法

の問題に関しては、特に、背景の項で述べてある。

いくつかの増幅反応、例えばPCRおよびLCRは、高温と低温が交互になるサイクル、すなわち「熱サイクル」として知られる工程を含む。PCR、すなわち「ポリメラーゼ連鎖反応」は、通常は熱安定性であるポリメラーゼ酵素が、元の核酸を鋳型として使用するプライマーの伸長により元の配列の多数のコピーを生じさせる増幅反応である。PCRのより詳細については、USP 4,683,202およびUSP 4,683,195に記載されている。LCR、すなわち「リガーゼ連鎖反応」は、通常は熱安定性であるリガーゼ酵素が、2個以上のオリゴヌクレオチドプローブを標的にハイブリダイゼーションさせながらそれらのプローブを連結することにより、元の配列の多数のコピーを生じさせる核酸増幅反応である。LCRおよびその変法であるギャップLCRのより詳細については、EP-A-320-308 (Backmanら)、EP-A-439-182 (Backmanら) およびWO 93/100447 (Birkermeierら) などに記載されている。

「熱サイクラー」は、核酸増幅反応混合物を、設定した時間、設定した温度で又は温度間で、加熱、冷却および／または保持するために使用する装置である。

「単位用量」は、1個の反応容器が、反応をなしとげるのに必要な、サンプル以外の全部またはほぼ全部の試薬を含む系を意味する。一般に、使用者は、ただサンプルを添加して反応を開始するだけである。典型的には、単位用量反応容器は使い捨てであり、1回の使用の後に捨てる。

2. 反応容器

本発明の反応容器¹⁰を図2～6に示す。反応容器¹⁰は、本明細書では「チューブ」、「使い捨てのもの」および「容器」とも言い、それらの用語は交換可能に使用される。先行技術のチューブの多くの部分が類似しているので、それらは、同じ参照番号に「a」を添えて、例えば図1の先行技術のチューブは^{10a}として記載する。

容器は、閉じた端¹³を有する円錐状の先が細くなった底部¹²および円筒部分¹⁴を含む縦方向の胴部を含む。先が細くなった部分¹²の通減度および長さは、市販の熱サイクル加熱ブロック（図示していない）に適合するようにしてある。例えば、通減度は中央線から約9°であり、先細部分¹²の高さは約13mmであり、先細

部分12の最も広い点の直径は約7mmである。これらの寸法は、装置の操作に対して決して臨界的なものではない。

それらは単に、Perkin Elmer 480などの市販の熱サイクラーへの密接な適合を容易にするだけである。熱サイクラーによく適合し、チューブ壁が薄いと、熱ブロックと反応混合物との間の熱エネルギーのより効率的な移動が促進される。一般に、チューブ壁は、約0.040インチ未満、好ましくは、約0.030インチ未満である。本明細書に記載する特定の態様では、 0.024 ± 0.004 インチの壁を必要とする。

容器の胴部は、先細部分と結合した円筒部分14も含む。その円筒部分は、先細部分の最も広い部分と同じ外径、すなわち好ましい態様では約7mmを有する。円筒部分の長さは重要ではなく、容器内部の必要な容積、キャップ機構の高さおよび型、ならびに熱サイクラーになんらかの型のふた(lid)が使用されているかどうかによって支配される。全体の長さは約5~30mm、好ましくは10~20mmである。好ましい態様では、円筒部分14は、容器の胴部にバーコードラベルなどのラベルを付着することができるように、約17mmの長さである。

円筒部分14の上端は、外側に向かって放射状に広がって、開口部16を規定している。先細部分12および円筒部分14が一緒になって内部15を規定し、その中に反応サンプルおよび試薬を入

ることができる。開口部16は、キャップ20によって容易にかつびったり密閉するための射出縁(radiused edge)18を含む。

キャップ20は、キャップの開閉を容易にするためのタブ手段22を含む。キャップはさらに、開口部16にぴったり適合し、射出縁18またはその射出縁のすぐ下の内部壁に対して効果的な密閉が得られるように作った外周26を有する、一般的に円筒状のシール部材24を含む。この理由により、シール部材24は、図2および4に最も良好に示すように、わずかに先細りになっており、キャップ本体20から最も離れた端の外周26の方が大きくなっている。

円筒状のシール部材24の閉じる一端は上部カバーである。図2では、これを薄い膜28として示す。一方、図1では、本発明の膜28と有意に異なるので、先行技

術のカバーを29として示す。先行技術のチューブのカバー29の目的は、単に、容器を閉じて中身が漏れるのを防ぐことである。従って、そのカバーは、チューブ10aの残りの壁と同じ材料およびほぼ同じ厚さで成形される。これに対して、本発明に係る容器10の膜28は、下記の方法の項で記載するように、装置のプロープによって貫通することができるように有意に薄くなっている。

好ましいカバー28は、厚さが 0.005 ± 0.001 インチ(0.125 ± 0.025 mm)であるが、該厚さは、 $0.002 \sim 0.015$ インチ($0.05 \sim 0.375$ mm)、好ましくは $0.002 \sim 0.01$ インチ($0.05 \sim 0.25$ mm)、より好ましくは $0.005 \sim 0.009$ インチ($0.125 \sim 0.225$ mm)の範囲でもよい。本質的に、膜28は、通常の手扱いの際に破れたりしないよう十分強くなければならないが、装置のプロープによる穴あけに耐えるほど強くてはいけない。すなわち、最大強度／厚さは、膜組成物の引張強度、膜サポートの形状、ならびに特定の装置のプロープの強度および下方への押圧力によって支配される。これらの規準は、チューブの組成および使用する装置システムにかなり依存する。本発明の好ましい厚さは、改良したIMx(登録商標)装置(下記4項参照)の、先端が45度の傾斜を有する、直径が0.040インチのステンレス鋼製プロープにより900g以下の力を受けるHimont PD701樹脂(Himont USA, Inc., Wilmington, DE)に対して選択した。他の組成物に関する、または他の装置システムにおけるこれらのパラメーターの評価および最適化は、当業者であれば容易に実施される。

一般に、図2では30として、図1では31として示す蝶番は、キャップ20を、薄くて柔軟な峡部を介して容器の胴部に対し保

持する。蝶番30、31は、キャップ20を取扱いやすく保持するが、円筒形のシール部材24をチューブの開口部16に挿入できるよう折り重ねることができるのに十分な柔軟性を有する。外周26とチューブの開口部16との間のぴったりした密閉は、これらの部分の間の公差がぴったり合っていることを必要とし、また、そのような蝶番は、キャップをチューブの開口部からはずすための柔軟性を有するということは、直ちに理解される。これらの部分がぴったり適合していると、キャップ

の最も滑らかな挿入は、円筒状シール24の側面が縦方向部分14の壁にほぼ平行であるとき、言い換えると、「迎え角」 θ （図6参照）がほぼ0であるときに生じることにも明らかである。すなわち、蝶番の構成には考察の兼ね合いがある。一方では、蝶番の材料を最少限にして、キャップ本体20をチューブの胴部14に近づけるのが望ましいが、こうすると、図6に示すように、キャップシール部材24が過酷で最適でない迎え角 θ で開口部16に入ることになる。他方、迎え角 θ の最適化は、かなり長い蝶番部分を使用することを必要とし、これはすなわち、材料の浪費および反応容器の有効な最大半径の大きさの増加を意味する。

本発明は、これらの兼ね合いの問題を、先行技術の蝶番31と

は有意に異なる新規の「折り畳み式」蝶番30を提供することにより克服するものである。「折り畳み式」蝶番は、折り畳み箇所または「コーナー」が2個以上存在し、これらの折り畳みの角度の和は、キャップがチューブを密閉するために折り返されなければならない円弧であるため、約180度であることを特徴とする。蝶番30は、縦方向の部分14のフレアー部分の延長部分32およびキャップ本体20の延長部分34を含む。二つの延長部分32および34は、中央の突起部分(spine ridge)35から、各々、溝36および38によって分離されている。二つの溝は互いに距離 g の間隔を置いている（図2および3参照）。図5に最もよく示されているように、折り畳み構造は、溝36および38に二つ（またはそれ以上）の柔軟点を可能とし、実際には図5の量 d だけ、有効な全体の半径が減少するけれども、より好ましい迎え角が容易に得られる。図5のもとになる実際の態様では、 d は約0.02インチである。

距離 x は、キャップが閉じた位置にある場合の、胴部14の外側からはみ出た蝶番の最大の量を表す。キャップタブ22は蝶番30以上には伸びていないので、蝶番が全体の最大半径を表すと考えられる。本発明の好ましい態様では、 x が約0.154インチ

以下、好ましくは約0.149インチ以下である。距離 r は、有効な全体の半径の別の目安であるが、 r は円筒部分14の直径とともに変わる。

距離 h は、キャップを閉じたときの蝶番部品の全体の高さであり、キャップ本体20および円筒部分14の外側に広がった、蝶番がチューブと結合しているところのフランジを含む。典型的には、突起部分35とほぼ同じ高さである。距離 h は、二つの溝36および38の間の距離 g にも関連する。示した好ましい容器では、 h は約0.103インチであり、 g は約0.087インチである。すなわち、この態様の g/h 比は0.84であるが、0.8の比から20%、好ましくは、約10%以下だけ変わってもよい。図5に示すように、延長部32および34はほぼ等しく、突起部35は、実質的に延長部に対して垂直になり、チューブの胴部の縦軸に対して平行になり、各柔軟点または「コーナー」は約90度の角度を規定する。

約0.8よりかなり大きい g/h 比は、延長部32および34の長さの違いに対応して「コーナー」に一つの鋭角および一つの鈍角を作る傾向にある。これはまた、曲がった突起部35を生じる傾向にある。

本発明の使い捨て容器10は、反応混合物の成分または増幅反応生成物との相互作用に関して不活性であるポリマー材料から成る。その材料は、蝶番のはたらきを可能にし、プローブによる膜28の貫通を可能にするために、幾分柔軟性があるべきであり、好ましくはオートクレーブに入れることができるものである。好ましいポリマーはポリプロピレンであり、それによって、膜28を含む装置全体を成形することができる。多くの等級のポリプロピレンが市販されている。Himont P D701ナチュラル (Himont USA, Inc., Wilmington, DE) などの樹脂は、十分な不活性性および柔軟性を示し、オートクレーブに入れることができるので、好ましい。薄い膜28の領域のキャビティを均一に充填するために、高い射出圧および／または「コイニング」として知られる技術が必要であるかもしれないが、装置全体は射出成形することができる。

シリコーン油または鉱物油などの成形離型化合物を使用することができるが、ステアリン酸またはパルミチン酸マグネシウムもしくは亜鉛などの2価のイオンを含む成形離型化合物は、そのようなイオンが増幅工程で使用する酵素の活性に影響を及ぼす場合は、避けることが重要である。

3. 使用方法

上記反応容器は、汚染の可能性のあるかなりの量の核酸が生じる増幅反応、特に熱サイクル増幅反応で有用である。本発明の好ましい方法は、LCR反応との使用であり、この詳細を本明細書に記載するが、その方法は、他の増幅反応でも等しく有用であることは認識されるべきである。

好ましい方法によれば、反応チューブをまず熱サイクラーなどの増幅装置におき、適切な温度で予め定めた時間、インキュベートする。LCRは4個一組のプロープを二つの相補対で使用し、それらの対は、標的にハイブリダイゼーションするとき、互いに実質的に隣接して置く。リガーゼ酵素は好ましくは熱安定性で、隣接するプロープと共有結合する。分離した後、結合したプロープは、次のサイクルで相補的プロープに対する鋳型または標的となる。典型的な変性温度は75~90℃の範囲であり、典型的なアニーリング温度は50~65℃の範囲であり、当業界で周知のように、プロープの溶融特性に依存する。

特に好ましい変形では、「単位用量」使い捨てチューブを有するキットが提供される。これは、そのチューブが、予め測定された適量のプライマーまたはプロープ、緩衝液およびリガー

ゼまたは他の酵素を含むことを意味する。典型的には、患者のサンプルだけを反応チューブに添加すればよい。しかし、一つの変形では、2価の金属イオン、特に Mg^{2+} を単位用量組成物から除くと、安定性が長くなり、標的に依存しないバックグラウンドの連結の発生を減少させることができることが分かった。典型的な単位用量チューブは、約100 μ lのLCRまたはPCR反応混合物を含む。PCRの場合、これは、増幅すべき標的配列に隣接するプライマーの混合物（好ましくは、少なくとも1つのプライマーは、検出用に標識化する。）、デオキシヌクレオチド三リン酸（dNTP）、熱安定性ポリメラーゼ、サケの精液DNAなどの非妨害DNA、界面活性剤および緩衝液を含む。LCRの場合、組成物は典型的には、検出する標的配列に対して特異的なLCRプロープ、熱安定性リガーゼ、サケの精液DNAなどの非妨害DNA、NAD、界面活性剤および緩衝液を含む。ギャップLCRの場合は、特異的dNTPおよび熱安定性ポリメラーゼも存

在する。しかし、PCR、LCRおよびギャップLCRにおいて、補助因子である Mg^{2+} イオンは除くのが好ましく、その場合は、キットに供給される補助溶液からも添加することができる。単位用量組成物中の Mg^{2+} イオ

ンの濃度は、0または少なくとも十分低くして、酵素の活性化には不十分であるようにすべきである。一般に、酵素活性を阻害するのに十分な濃度は、 $10^{-4}M$ 以下である。

単位用量試薬チューブは、箱の中に入れて密閉し、室温以下、好ましくは2~8℃、または凍らせて保存するが、使用前に室温と平衡にさせる。単位用量チューブを開けて、 $100\mu l$ の前処理したサンプル試料を添加する（全反応体積が約 $200\mu l$ の場合）。この態様では、 Mg^{2+} イオンがサンプル希釈緩衝液に存在する。使用に際しては、サンプルを、適量のマグネシウムを含む緩衝液または希釈液に入れて混合する。サンプル（例えば、 $100\mu l$ ）を抽出して増幅単位用量に添加するとき、マグネシウムも添加される。サンプル処理緩衝液中のマグネシウムの濃度は添加するサンプルの体積および抽出される体積に依存する。あるいは、マグネシウムを、サンプル緩衝液を受け取らないコントロール反応に添加する場合、マグネシウム（または単位用量から除いた他の補助因子）は、マグネシウムイオンの補助溶液から反応溶液に添加することができる。一般に、添加量は、最適な酵素活性を付与するのに十分であるようにすべきであり、本発明のLCR反応では約30mMである。

これらの方法によってテストされる生物学的試料としては、子宮頸管内膜スワブ、尿道スワブ、尿、血液、スミア(smears)、皮膚および頭髮抽出物などが挙げられる。

次いで、チューブを閉じて、Perkin-Elmer 480核酸サイクラーなどの熱サイクル装置に移し、そこで増幅反応を行う。チューブを作業台から熱サイクラーに移す（および再び戻す）ための一つの方法およびシステムは、本出願人による米国出願No.08/141,243（1993年10月22日出願）「チューブ輸送システムおよび使用方法」（代理人名簿5453.US.01）（現在は放棄）に開示されている。

増幅した後、チューブを、好ましくは自動化された検出装置へ移す。検出の好ましい方法は、増幅産物の自動検出に対して微粒子捕獲酵素イムノアッセイ (MEIA) を使用することである。MEIAは、Fioreら、Clin. Chem. 34(9):1726-1732(1988)およびEP-A-288,793に記載されており、この方法を利用した市販の臨床分析機は、Abbott Laboratories (AbbottPark, IL) から市販されている IMx (登録商標) 装置である。増幅産物のMEIA検出の場合、捕獲ハプテン (capturehapten: ハプテン1) および検出ハプテン (ハプテン2) の

両方が各増幅産物に会合 (例えば、共有結合) しなければならない。ハプテンをPCRまたはPCR反応生成物に混入することは、例えば、EP-A-0357011およびEP-A-0439182で公知である。簡単に述べると、その方法は、対の反応性物質と結合したプライマー (PCR反応において) を使用するものである。対の反応性物質は、固相に結合することができ、および/または標識化されたコンジュゲートによって検出することができる。対の反応性物質は、ハプテンおよび抗体、ビオチンおよびアビジン、酵素および酵素受容体、炭水化物およびレクチン、ならびに対の相補的DNA鎖の群から選択した。

異なる多くのハプテンが知られており、本質的に、どんなハプテンも本発明に使用することができる。プローブにハプテンを添加する多くの方法が文献で知られている。プローブ標識化方法は、Enzo Biochemical (New York) およびClontech(Palo Alto)が共に記載し、市販している。例えば、第一アミンは、3'-アミン-ON CPG (登録商標) (Clontech, Palo Alto, CA) を使用して3'オリゴ末端に結合することができる。同様に、第一アミンは、Aminamodifier II (登録商標) (Clontech) を使用して5'オリゴ末端に結合することができる。

アミンは、通常の活性化を使用し、化学作用を組みあわせることにより、種々のハプテンに反応させることができる。あるいは、標識-ホスホルアミジト試薬を調製し、それを使用して、合成中にオリゴヌクレオチドのいずれかの位置に標識を付加する。例えば、Thuong, N.T.ら、Tet. Letters, 29(46):5905-5908(1988);またはCohen, J.S.らの米国特許出願07/246,688(NTIS ORDER No. PAT-APPL-7-2

46,688)(1989)参照。

ハプテンのいくつかの例としては、多くの薬剤（例えば、ジゴキシシン、テオフィリン、フェンシクリジン（phencyclidine：PCP）、サリチル酸塩（Salicylate）など）、T3、ビオチン、フルオレセイン（FITC）、ダンシル、2,4-ジニトロフェノール（DNP）；ならびにプロモウラシルなどの修飾ヌクレオチドおよびN-アセチル-7-ヨード-2-フルオレニルアミノ（AIF）基の挿入により修飾した塩基などが挙げられる。本明細書に記載するハプテンは、本出願人による審査中の特許出願US 07/808,508（アダマンタン酢酸）、US 07/808,839（カルバゾールおよびジベンゾフラン）（共に1991年12月17日出願）；US 07/858,929（アクリジン）およびUS 07/858,820（共に1992年3月27日出願）（本明細書では、合わせ

て、「ハプテン出願」と言う。）に開示されている。

LCR（もしくはPCRまたはその他）の増幅産物を含む閉じた単位用量容器を、改良IMx（登録商標）分析機の楔形ホルダーに移す。楔形ホルダーおよびIMx分析機に対する改良を以下に記載する。

装置内では、ロボットアーム上の中空(hollow-bore)のプロープがマイクロプロセッサおよび適するソフトウェアによって反応容器の上の位置に誘導され、該プロープは、膜28を破壊することにより容器内に下ろされる。蠟またはグリースがないので、正確な液体レベルを感知することができる。サンプル流体に到達すると、プロープが予め定めた量の増幅反応混合物を吸引し、吸引した増幅反応混合物を付随したインキュベーションウェルに自動的に移し、そこで、抗ハプテン1抗体で被覆された微粒子を含むMEIA捕獲相と共にインキュベートする。反応生成物の増幅チューブからインキュベーションウェルへの移動は、チューブを開けることなく、また、反応混合物をこぼす可能性またはエロゾルの生成もなく行われる。このことはまた、反応していないサンプルが増幅可能な増幅産物で汚染される可能性をかなり減少させることになる。さらに、プロープ

は、反応混合物から蓄積する蠟状物質により塞がれることがない。

プローブは、別の反応容器を貫通する前に洗浄するために、洗浄位置へ移動し、この工程は、全反応チューブのサンプリングが行われるまで続き、そして、インキュベートされる。この洗浄工程は、あるサンプルから次のサンプルへの汚染の持ち越しを回避するものである。インキュベーションの後、微粒子懸濁物の一部をプローブで吸引し、付随した検出セルのガラス繊維マトリックス上に置く。そこでは、微粒子を溶液の残りから分離し、マトリックス上に保持する。捕獲された粒子を洗浄し、IMx（登録商標）アッセイで通常行われるように、酵素標識コンジュゲート（抗ハプテン2に結合したアルカリホスファターゼ）を添加し、インキュベートする。マトリックス上に捕獲された、インキュベートされた捕獲微粒子／増幅産物／コンジュゲート複合体を洗浄した後、コンジュゲートの酵素標識に対する基質を添加する。被分析物DNAの有無を、基質である4-メチルウンベリフェリルホスファートの蛍光性4-メチルウンベリフェロンへの変換による蛍光シグナル発生の速度を測定することにより検出する。基質転換の「速度」は、カウント／秒

／秒(c/s/s)で表し、「装置ノイズ」バックグラウンドは8~12c/s/sが典型的である。

検出完了後、プローブは好ましくは、インキュベーションウェル、検出セルおよび反応チューブの全領域に化学的不活性化試薬を分配する。これは、存在する全てのDNAを化学的に破壊して、今後のサンプルまたは試薬の不注意な汚染を排除するものである。適する銅フェナントロリン化学的不活性化組成物は、本出願人による、審査中の米国特許出願07/863,662「ヌクレオチド配列の不活性化法およびそこで使用するための金属キレート」（1992年4月3日出願）に記載されている。

4. 反応容器ホルダーおよびIMx（登録商標）分析機に対する改良

本発明の別の態様は、反応チューブの容器ホルダー60に関し、それは、寸法安定性を有する構造物を支持するのに十分な剛性を有する適切なプラスチック材料で作ることができる。プラスチックの例としては、ABSまたはスチレン-アクリロニトリル（SAN）などのポリカルボネートおよびポリスチレンがある。ホ

ホルダーは図7に示す。それは、実質的に平面の土台62を有し、それは、一方の端64が他方の端66より広がっている。

こうすると、いくつか(20~40個)のホルダーが円形コンベヤ(図示していない)の扇形に合うようにした台形または楔形になる。土台は、容易に握れるようにするため、放射状の内側の端に型タブ68を含む。

土台62には3個の構造物が型取られている。これらの構造物のどれも正確な形状は臨界的でない。唯一必要なことは、それらが、下記に述べる目的に対して十分な容積を有し、楔形ホルダーを円形コンベヤの定位置に載せるときに妨げにならない様に形成されていることである。第一の構造物はタブ68に隣接しているウェル70であり、図に示した態様では長方形である。ウェル70は底が閉じており、反応混合物を保持し、インキュベートするように作られている。隣の構造物は、楔形ホルダーの中央近くの穴72である。好ましくは、下方に伸びる側壁74(この場合は円筒状)で補強する。穴72は、上記反応容器を受け入れるように作られる。穴の面積は、反応容器の横断面積に対応し、反応容器がホルダー内で有意に動き回らない程度に、ほんのわずかに大きくすべきである。

第三の構造物は、検出セルまたは区画76である。検出セルは、市販のIMx(登録商標)装置の検出セルと本質的に同一である。

それは、最初に入れる反応サンプルを保持するための斜めに曲がった漏斗状の構造物；漏斗の底部にあり、典型的にはガラス繊維である反応マトリックス80、および反応マトリックスの下に置いた吸収部材82(図7の部分的に切断した図により、セル76の内部に示す)を含む。IMx(登録商標)装置と同様に、検出セル76は、捕獲微粒子をガラス繊維マトリックス80に集め、液体試薬および洗浄溶液がマトリックス80を通して吸収部材82に入るのを可能にする。

ホルダー60は、ホルダーを円形コンベヤに取りつけてロックするとともに、下方に伸びている構造物70、74および76の間のヘリ(webbing)を補強するための手段も含む。

改良された容器ホルダー60は、穴72が反応チューブを受け入れるように作られ

ているので、先行技術のIMx（登録商標）楔形とは異なる。IMx（登録商標）楔形は、その穴の代わりに、この位置に1個以上の別のサンプルウェルを含んでおり、別の物理的構造物または成分を受け入れるようには作られていない。

円筒状の反応チューブ¹⁰および対応する丸い穴⁷²の場合、反応チューブは、土台⁶²において回転できることが理解される。典型的には、キャップタブ手段²²および蝶番³⁰の一方または他

方が最大半径の先端を規定するので、これらの先端によって描かれる弧（図7の84の点線で示す）が、チューブが穴の中で自由に回転できるような明確な経路を規定することが保証されることが好ましい。

市販のIMx（登録商標）装置に対して成されるハードウェアの改良としては、以下のことが挙げられる。ソフトウェアの改良がいくつかの変更に伴うが、当業者によって容易に最適化されるので、ここには記載しない。そのように改良した装置は、本明細書ではLCx（商標）装置と言う。

- 1) 自動ピペッター機構を補強して、使い捨て増幅チューブ¹⁰上の膜シール²⁸の貫通を、プローブを損傷することなく可能にした。これらの変更は、ガイドロッドを強化し、ガイドロッドおよびトップクロスロッドを加えることであった。
- 2) 膜シール²⁸の貫通を容易にするために45度の角度の鑿状にした、直径約0.040インチのステンレス鋼製の単一先端ピペッティングプローブを、IMxの標準ピペットおよび電極と置き換えた。
- 3) 単一先端プローブの使用は、コンダクタンスモード液体レベル感知装置(ductance mode liquid level sense apparatus)

us)を放棄しなければならなかった。その代わりに、キャパシタンスレベル感知機構(capacitance level sense mechanism)を採用した。これは、ピペッティングプローブが発信機(transmitter)として作用し、受信プレート(receiver plate)が試薬パックおよび円形コンベヤの下に位置することを必要とした。そのようなキャパシタンスレベル感知装置は公知である。

- 4) プローブの洗浄ステーションを、プローブの先端以外も洗浄できるようによ

り深いものにした。プローブによって膜シール28を貫通するので、膜の裏側からプローブ先端上のより高いところに汚染が蓄積する可能性があった。

5) プローブの先端を容器から引き上げているときに、ホルダー60に入っているチューブ10を保持するために、チューブ保持機構を加えた。保持器は、反応チューブ上で、プローブを引き上げようとする位置にブームアームの向きを変えることができる回転可能な軸受台を含む。ブームアームは、プローブが通過するスロットまたは開口部、ならびにチューブをホルダー60の正しい位置に保持するためにチューブキャップ20を接触させるデフレクター(deflector)部分を含む。

6) F P I A希釈緩衝液ボトルを、不活性化希釈剤(5%の過酸

化水素溶液)を含むボトルで置き換え、ソフトウェアを、標準のM E I A希釈剤および不活性化希釈剤の両方が利用できるように変更する。

実施例

実施例1. 貫通可能なキャップチューブ:

図2~4に示すチューブを成形するために射出鋳型を作った。使用した樹脂は、Himont PD701ナチュラル(Himont USA, Inc., Wilmington, DE)であり、添加物または離型剤は使用しなかった。成形中、膜の部分は、貫通可能な膜の厚さがより均一になるように鋳造(coin)し、 0.005 ± 0.001 インチに調整した。チューブをオートクレープに入れて滅菌し、可能なヌクレアーゼ汚染を排除した。

実施例2. LCx(商標)装置

IMx(登録商標)装置を、上記4項に記載したように改良した。

実施例3. Chlamydia trachomatis LCR単位用量チューブ

実施例1に係る反応チューブは、多重ピペッター(multiplepipettor)またはリピーターピペッター(repeater pipettor)を使用して充填し、 $100 \mu\text{l}$ のマスター試薬を各チューブに分

配した。その結果、各単位用量試薬チューブは、 $2 \times \text{LCR}$ 緩衝液(100mM のE P P S、 40mM の K^+ [KOH および KCl 由来]、 $200 \mu\text{M}$ のN A D)中に次の成分を含んだ。

・ *Chlamydia trachomatis* 潜在(cryptic)プラスミドの6917~6964の位置に特異的な4個一組のギャップLCRプローブ。これらのプローブの詳細は、審査中の米国出願No. 08/116,389(1993年9月3日出願)(代理人名簿 5372.US.01)に記載されており、各プローブは、 1.2×10^{12} 分子/ $100 \mu\text{l}$ で存在する；

・ $1 \mu\text{g}$ のアセチル化牛血清アルブミン (BSA)、 1.0mM の EDTA、および0.04重量%のアジ化ナトリウム；

・ $3.4 \mu\text{M}$ の dTTP および $3.4 \mu\text{M}$ の dCTP (ギャップ充填ヌクレオチド)；

・ 2 単位の *Thermus flavus* DNA ポリメラーゼ；ならびに

・ 1,800単位の *Thermus thermophilus* DNA リガーゼ

単位用量チューブには、 Mg^{2+} (または Mn^{2+}) イオンは存在させなかった。チューブのキャップは閉じて、使用するまで 8°C で保存した。

実施例4．実験手順

$100 \mu\text{l}$ の *Chlamydia trachomatis* 標準物質またはその標準

物質の1:2希釈物を、実施例3で作ったいくつかの単位用量チューブの各々にピペットで入れた。標準物質中の *Chlamydia* DNA の量は、標準曲線により、 $100 \mu\text{l}$ につき2.0封入体形成単位に等しいと推定する。ネガティブコントロールは、150ngのサケの精液DNAであった。 MgCl_2 を活性化試薬として、 30mM ($200 \mu\text{l}$ 中) の最終濃度で添加した。実際のテストサンプルの場合、 Mg^{2+} は、試料移動緩衝液に入れて供給し、サンプルを含む単位用量チューブに添加する。

チューブをPerkin Elmer 480熱サイクラーに置いた。サイクル条件は、 97°C で1秒、 55°C で1秒および 62°C で50秒を全40サイクルであった。

熱サイクル工程完了後、チューブをLCx (商標) 装置に移した。各チューブを円形コンベヤ上に置いたホルダー (楔形) に設置し、円形コンベヤを装置に入れた。サンプルチューブ保持器を円形コンベヤの上部に束縛して、ピペッティングプローブを引き抜くときにチューブが持ち上がるのを防いだ。試薬パックを装置に置いた。試薬パックには、下記組成物のボトルが含まれていた。1) 抗-カルバゾール被覆微粒子、2) アルカリホスファターゼ標識化抗アダマンタン、3) 基質のメチルウン

ベリフェリルホスファート、および4) 銅フェナントロリン／トリス緩衝液。

二重サンプルの4回の実験に対する結果を表1に示す ($n=8$)。

表 1

閉じたチューブにおけるLCR
Chlamydia trachomatis アッセイ結果

サンプルの種類	平均シグナル (c/s/s)	S D	範囲	
ネガティブ コントロール	7	2	6~12	2字抹 5字加
標準物質の 1:2希釈物	484	45	443~558	
標準物質	862	71	791~962	

実施例5. 不活性化

不活性化溶液は、0.1Mの銅フェナントロリン／トリス緩衝液であった。不活性化希釈液は、5%の過酸化水素溶液であった。LCx (商標) 装置は、インキュベーションウェル、反応チューブおよび検出セルの各々に50~60 μ lの不活性化溶液をピペットで移し、次いで、60~80 μ lの不活性化希釈液が円形コ

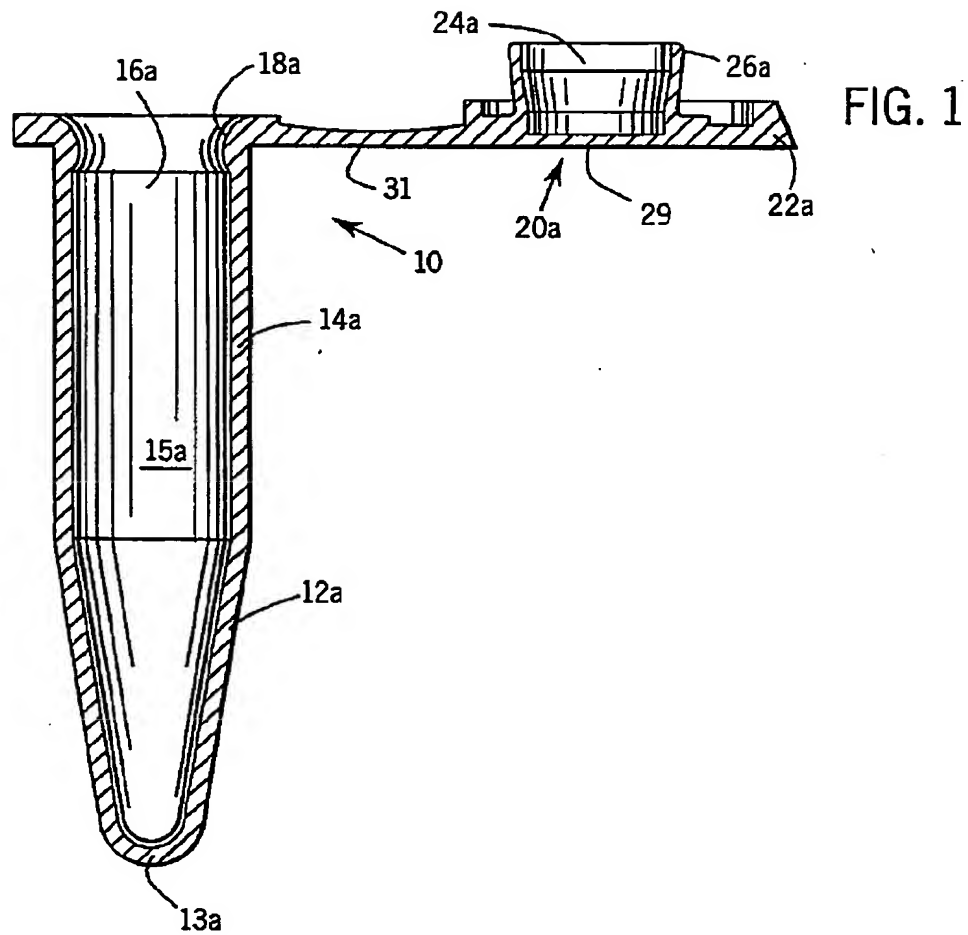
ンベヤの全楔形ホルダー上の各位置にピペット移されるようにプログラムする。

実施例6. 試料の処理および結果

標準的な培養法でChlamydia trachomatisのテストを行った72個の子宮頸管内膜スワブの集団を、実施例1の反応チューブを使用して、実施例4の方法でもテストした。試料は、MgCl₂を十分含む試料緩衝液で希釈して、最終濃度を約30mM(200 μ l中)にした。図8は、サンプル数対速度シグナル(カウント/秒/秒)の度数分布を示す。培養法のテストにより陽性であった3個のサンプルは、シグナルが500カウント/秒/秒より高かった。培養法のテストにより陰性であった69個のサンプルは、平均シグナルが30カウント/秒/秒未満であった。陰性の集団+2標準偏差の平均は、500カウント/秒/秒未満であった。

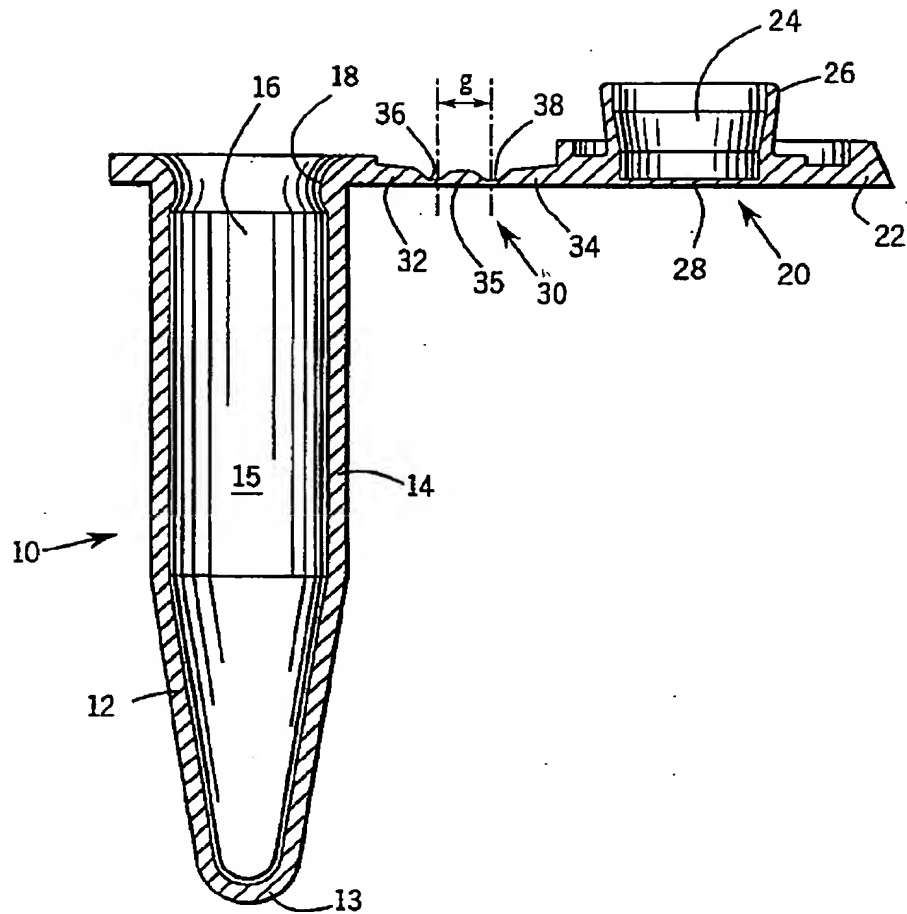
実施例は、本発明の種々の態様を説明するだけのものであり、保護範囲は添付の請求の範囲によって規定される。

【図 1】



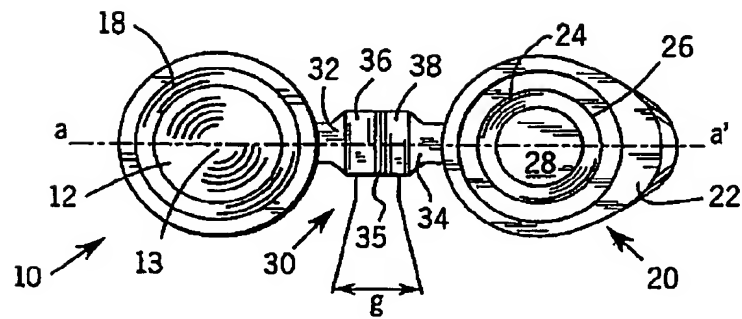
【図 2】

FIG. 2

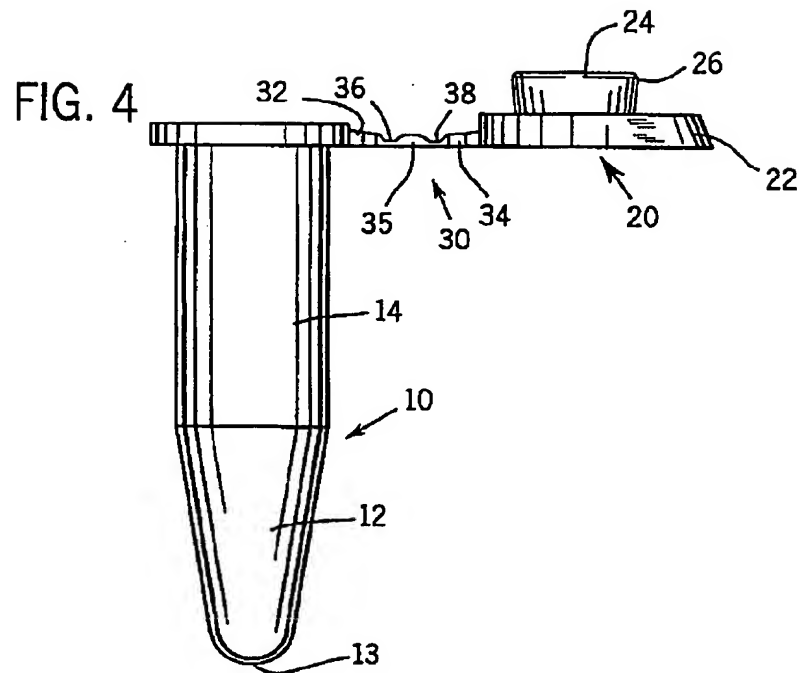


【圖 3】

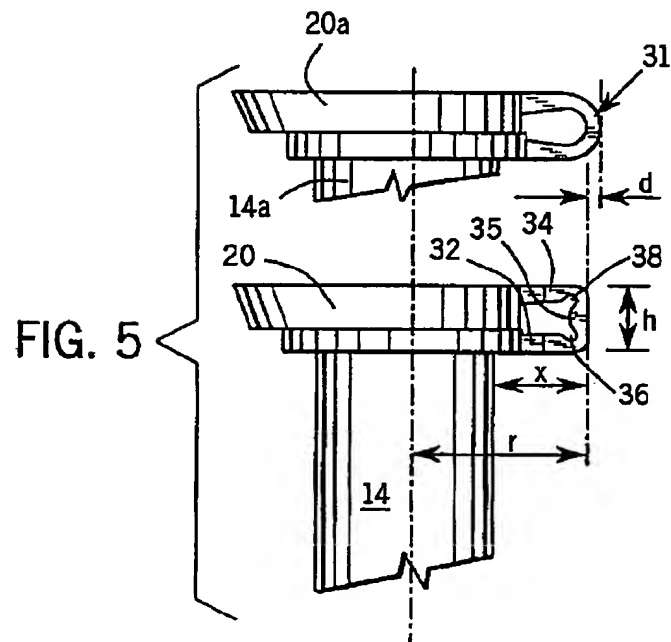
FIG. 3



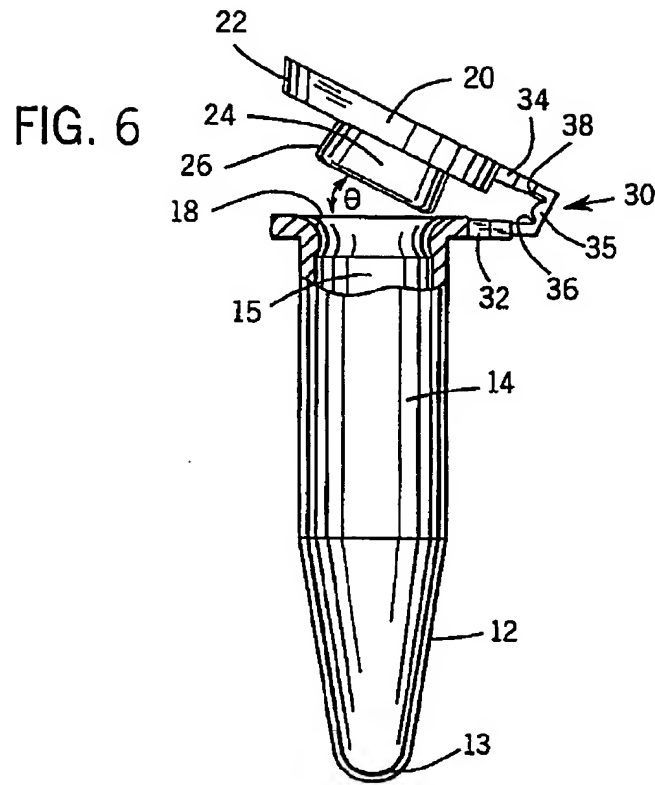
【圖 4】



【图 5】

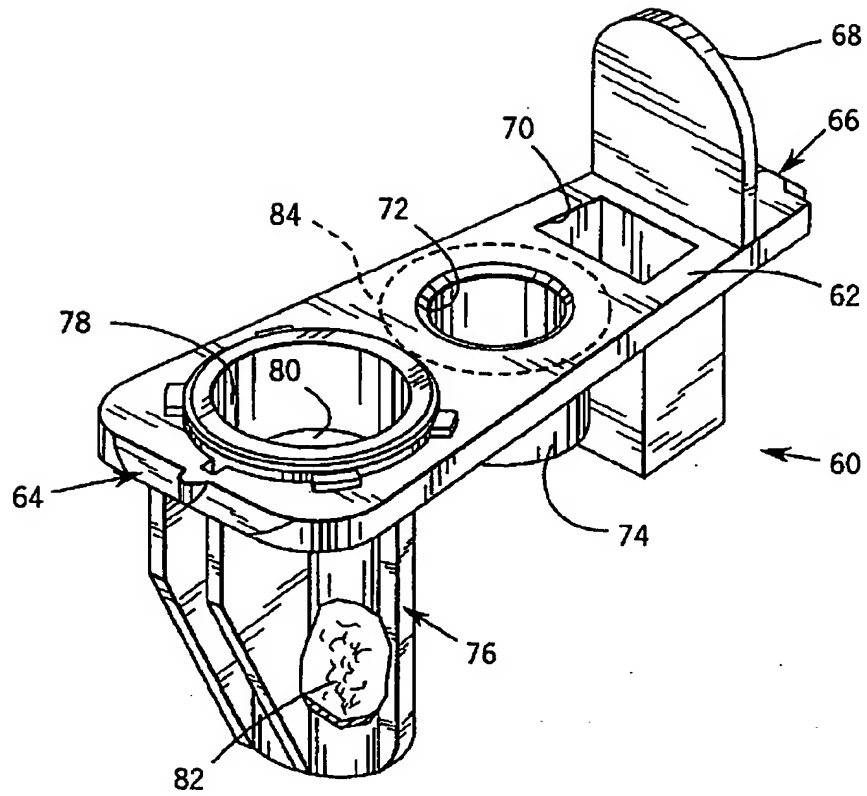


【図6】

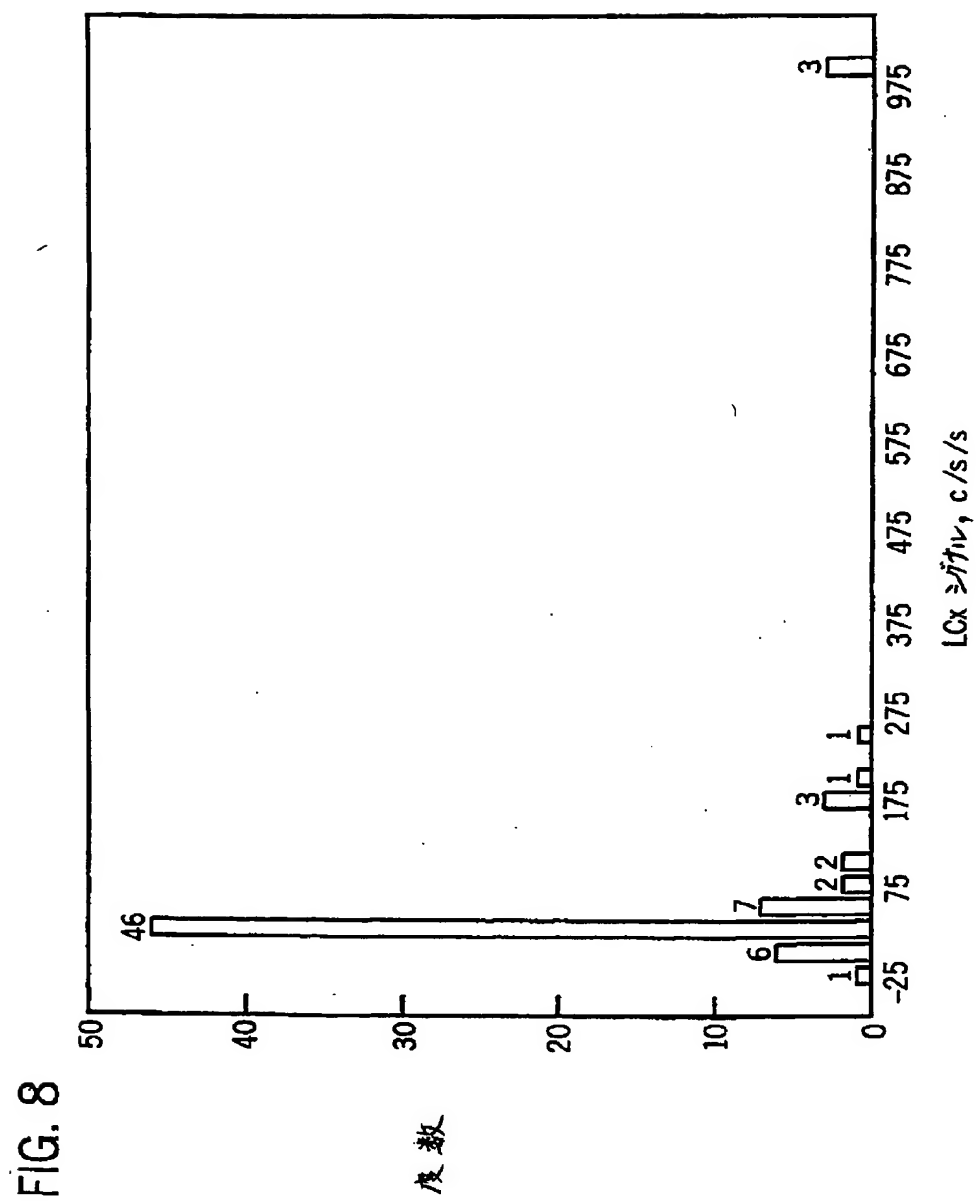


【図7】

FIG. 7



【図8】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter- national Application No. PCT/US 94/12125		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 B01L7/00 B01L3/14 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 B01L C12Q B65D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,92 01513 (MAX-PLANK-GESELLSCHAFT) 6 February 1992 see page 4, paragraph 3 see page 34, last paragraph - page 35, paragraph 1; figure 10 see page 35, paragraph 4; figure 10 see page 37, paragraph 2 - page 38, paragraph 2	1
Y	EP,A,0 341 342 (MULTI-TECHNOLOGY, INC.) 15 November 1989 see page 1, line 1 - line 20 see column 4, line 50 - column 5, line 29; figure 3 see column 7, line 37 - line 50; figures 4-6	1
Y		25
Y	see column 7, line 10 - line 36	29
	--- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 June 1995		Date of mailing of the international search report 07.08.95
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 581 8 Patentlaan 2 NL - 2210 MV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Authorized officer Osborne, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter- national Application No.
PCT/US 94/12125

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	IBM TECHNICAL DISCLOSURE BULLETIN, vol.30, no.9, 1988, NEW YORK, US; pages 189 - 190 'vial caps-membrane combination' see page 190, line 1 - line 3	4,5, 26-28
Y	---	25
P,A	EP,A,0 573 098 (EASTMAN KODAK) 8 December 1993 see column 5, line 1 - line 17 see column 5, line 47 - column 6, line 29 ---	1
A	EP,A,0 488 769 (PERKIN-ELMER CETUS) 3 June 1992 cited in the application see page 26, line 10 - line 13; figure 50 see page 26, line 49 - page 27, line 4 ---	25
A	US,A,5 035 996 (HARTLEY) 30 July 1991 cited in the application see column 3, line 46 - line 50 ---	2
A	US,A,4 720 385 (LEMBACH) 19 January 1988 see column 3, line 59 - column 4, line 7 see column 17, line 15 - line 41 ---	3
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 12, no. 446 (C-546) 24 November 1988 & JP,A,63 170 396 (SHIMADZU) 14 July 1988 see abstract ---	3
A	EP,A,0 081 976 (STERILIN) 22 June 1983 see page 2, line 6 - line 8 see page 2, line 20 - page 3, line 11; figures see page 4, line 23 - page 5, line 8 ---	4,5, 26-28
A	WO,A,91 16675 (APPLIED BIOSYSTEMS) 31 October 1991 see page 11, paragraph 3 - page 12, paragraph 2; figures 1,12 see page 13, last paragraph - page 14, paragraph 1 see page 31, paragraph 3 - page 33, paragraph 2; figure 7 ---	10
A	WO,A,91 15768 (SYNGENE) 17 October 1991 see page 23, line 29 - page 24, line 15; figures 1,2 see page 36, line 35 - page 38, line 30 ---	10
X	WO,A,91 12342 (CETUS CORP.) 22 August 1991 see claims 1-9; examples 1-5 ---	13-24
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 94/12125

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,92 01814 (CETUS CORP.) 6 February 1992 see page 31, line 3 - line 7 ---	13-24
A	WO,A,93 05174 (FILLER) 18 March 1993 see page 13, line 25 - line 31 ---	13,18
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol.88, no.1, 1 January 1991, WASHINGTON, DC, US; pages 189 - 193 F. BARANY: 'genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase' see the whole document ---	18-21
Y	US,A,4 674 640 (ASA ET AL.) 23 June 1987 see column 2, line 64 - column 3, line 5; figures 5,6 ---	29
A	US,A,5 016 777 (MARVIN) 21 May 1991 see column 2, line 48 - column 3, line 2; figure 2 see column 3, line 38 - line 64 ---	33-35
A	GB,A,858 959 (LOHRER) 18 January 1961 see claims 1,3,8; figures 1,3 ---	34,35
A	EP,A,0 149 797 (EPPENDORF) 31 July 1985 see page 11, paragraph 2; figures 1-3 see page 13, last paragraph - page 14, paragraph 1 ---	29
P,X	WO,A,94 02374 (INNERVISION) 3 February 1994 see page 9, line 4 - page 10, line 31; figure 7 -----	29-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In .ational application No.

PCT/US94/12125

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. CLAIMS 1-12, 25-28
2. CLAIMS 13-24
3. CLAIMS 29-35

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/210

LACK OF UNITY OF INVENTION

1. Claims: 1-12, 25-28

method for performing a nucleic acid amplification assay, wherein the transfer of amplified target nucleic acid is effected by piercing the cap membrane of an amplification vessel with a pipettor probe, and reaction vessel suitable for such a method, comprising a puncturable membrane of no more than 0.015 inches.

2. Claims: 13-24

Kits for performing a nucleic acid amplification assay comprising an amplification composition with a low concentration of Mg^{2+} in one container, and a sample treatment composition including a higher concentration of Mg^{2+} in a second container.

3. Claims: 29-35

Reaction vessel suitable for performing a nucleic acid amplification assay, whose sealing cap includes a puncturable membrane, wherein a bi-fold hinge holds the cap to the tube.

Nucleic acid amplification assays are known. The piercing of a membrane during such an assay appears to be the special technical feature claimed by claim 1. This feature also appears in claims 25-28, and the sets of claims 1-12 and 25-28 consequently satisfy the requirement of Rule 13.1 PCT.

The claims 13-17 and 18-24 do not refer to the piercing of a membrane, nor do they relate to any other special technical feature (in the sense of Rule 13.2 PCT) of claims 1-12. Therefore claims 13-17 and 18-24 do not relate to the same general inventive concept as claims 1-12 and consequently do not satisfy the requirement of Rule 13.1 PCT.

Claim 25 refers to a reaction vessel suitable for performing a nucleic acid amplification assay according to the method of claims 1-12. Claims 29-35 refer to a second kind of device suitable for performing a nucleic acid amplification assay according to the method of claims 1-12. Reaction vessels with a hinged sealing cap suitable for performing a nucleic acid amplification assay are known (see EP488769, fig 50). EP341342 describes such a small capped centrifuge container, withstanding boiling temperatures, and thus suitable for thermal cycling. The cap of this container is held to the tube by an hinge, and includes a puncturable membrane. EP341342 describes all the technical features common to claims 25 and 29. There is therefore no special technical feature in the sense of Rule 13.2 PCT which is common to claims 25 and 29: compared with the reaction vessel of EP341342, the special technical features of claims 25-28 would be the thickness of the puncturable membrane, whereas the special technical feature of claim 29 would be the bifold hinge. Therefore claims 29-35 do not relate to the same general inventive concept as claims 25-28 and consequently do not satisfy the requirement of Rule 13.1 PCT.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/US 94/12125

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9201513	06-02-92	DE-A- 4022792	06-02-92
		EP-A- 0539369	05-05-93
		JP-T- 6500727	27-01-94
EP-A-0341342	15-11-89	US-A- 4830209	16-05-89
		AU-B- 587953	31-08-89
		AU-B- 634468	25-02-93
		AU-A- 3001389	09-11-89
		CA-A- 1327760	15-03-94
		EP-A- 0341372	15-11-89
		JP-A- 1284348	15-11-89
		JP-B- 6024650	06-04-94
		PT-B- 89011	30-09-94
		US-A- 4874102	17-10-89
		US-A- 4896780	30-01-90
		US-A- 4953741	04-09-90
EP-A-0573098	08-12-93	US-A- 5364591	15-11-94
		JP-A- 6046828	22-02-94
EP-A-0488769	03-06-92	AU-A- 8832791	04-06-92
		CA-A- 2056743	30-05-92
		IL-A- 100209	15-03-95
		JP-A- 6233670	23-08-94
		US-A- 5282543	01-02-94
US-A-5035996	30-07-91	CA-A- 2017522	01-12-90
		EP-A- 0401037	05-12-90
		JP-A- 3058785	13-03-91
		JP-B- 7004248	25-01-95
US-A-4720385	19-01-88	US-A- 4534972	13-08-85
		AU-B- 557006	27-11-86
		AU-A- 2560584	04-10-84
		CA-A- 1223203	23-06-87
		DE-A- 3472894	01-09-88
		EP-A, B 0123877	07-11-84
		JP-C- 1826614	28-02-94
		JP-A- 59193830	02-11-84

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 94/12125

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0081976	22-06-83	AU-A- 9130382	16-06-83
WO-A-9116675	31-10-91	EP-A- 0478753	08-04-92
WO-A-9115768	17-10-91	AU-A- 7575291	30-10-91
		EP-A- 0523171	20-01-93
WO-A-9112342	22-08-91	AU-B- 653712	13-10-94
		AU-A- 7307391	03-09-91
		EP-A- 0515506	02-12-92
		US-A- 5411876	02-05-95
WO-A-9201814	06-02-92	AU-A- 8532791	18-02-92
		CA-A- 2087724	25-01-92
		EP-A- 0540693	12-05-93
		US-A- 5310652	10-05-94
		US-A- 5418149	23-05-95
		JP-T- 6501612	24-02-94
WO-A-9305174	18-03-93	AU-A- 1153692	17-08-92
		AU-A- 2481792	05-04-93
		AU-A- 8514291	15-04-92
		WO-A- 9204916	02-04-92
		WO-A- 9211846	23-07-92
		EP-A- 0548157	30-06-93
		EP-A- 0566590	27-10-93
		EP-A- 0601010	15-06-94
		FI-A- 940923	25-02-94
		JP-T- 6504274	19-05-94
		JP-T- 7500724	26-01-95
		NO-A- 940658	25-02-94
US-A-4674640	23-06-87	NONE	
US-A-5016777	21-05-91	NONE	
GB-A-858959		FR-A- 1210264	08-03-60
		LU-A- 36425	
EP-A-0149797	31-07-85	DE-C- 3402276	21-02-85

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 94/12125

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0149797		JP-C- 1748168	25-03-93
		JP-B- 4031945	27-05-92
		JP-A- 60183362	18-09-85
		US-A- 4713219	15-12-87
WO-A-9402374	03-02-94	US-A- 5295599	22-03-94
		AU-B- 4773893	14-02-94
		EP-A- 0651718	10-05-95

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	
G 0 1 N 33/566		9162-4B	C 1 2 N 15/00	A

(72)発明者 リー, ヘレン・エイチ
アメリカ合衆国、イリノイ・60045、レイ
ク・フォレスト、モーニングサイド・ドラ
イブ・825

(72)発明者 ベベ, カーティス・ジェイ
アメリカ合衆国、イリノイ・60050、マク
ヘンリー、コーネル・コート・3609

(72)発明者 ベルコ, テイモシー・ジェイ
アメリカ合衆国、ミズーリ・63130、セン
ト・ルイス、ウエストモアランド・ドライ
ブ・7017

(72)発明者 ズレツク, トーマス・エフ
アメリカ合衆国、イリノイ・60305、リバ
ー・フォレスト、アツシユランド・752

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第1部門第1区分
 【発行日】平成10年(1998)5月12日

【公表番号】特表平9-504690
 【公表日】平成9年(1997)5月13日
 【年通号数】
 【出願番号】特願平7-512246
 【国際特許分類第6版】

C12Q 1/68
 B01L 3/00
 11/00
 C12M 1/00
 // C12N 15/09
 G01N 33/566

【F I】

C12Q 1/68 A
 B01L 3/00
 11/00
 C12M 1/00 A
 G01N 33/566
 C12N 15/00 A

千続補正費

平成9年10月28日 通

特許庁長官 荒井 力 宛 製

1. 事件の表示 平成7年特許第512246号

2. 補正をする者
 事件との関係 特許出願人
 名 称 アボット・ラボラトリーズ

3. 代理人 東京都新宿区新宿1丁目1番14号 LJビル
 (郵便番号 160) 電話(03)3354-8623
 (6200) 弁護士 川 口 徹 雄

4. 補正命令の日付 自 発

5. 改正により増加する請求項の数 な し

6. 補正対象事項名 請求の範囲

7. 補正対象項目名 請求の範囲

8. 補正の内容

(1) 請求の範囲を別紙の通り補正する。



請求の範囲

1. 検査物質の増幅及び検出方法であって、下記工程；
 - a. 試料の検査物質を含むことが疑われるサンプルを、その疑わしい量的状態を検出するための増幅した試薬とともに増幅装置に添加して反応混合物を形成する工程；
 - b. 該容器内の反応混合物を、ビベクター・プローブによって測定可能な検出を有する完全閉鎖可能なキャップを閉鎖することにより密封する工程；
 - c. 該容器内の量的増幅物質を増幅する工程；
 - d. 反応混合物の一部を該容器から検出用に取り出す工程；および
 - e. 検出した試薬を検出することによって増幅した量的検出の存在を検出する工程；
- を含む、取り出す工程が、該キャップをビベクター・プローブで密封し、該反応混合物の一部を該ビベクターに吸引して、該一部を増幅装置のキャップを有することなく別個の検出器に分配することにより行われ、それによって、濃縮、電反的サンプルもしくは試薬を汚染する可能性のある増幅された物質の残存を

たはエーロゾルを回収する、採取物質の増減及び検出方法。

2. さらに、容器および検出部に貼っている金属箔物質を、ビ
ベクターから検出不能な状態に製成を致すおよび検出部に存在す
ることにより不活性化する工程を含むことを特徴とする請求項
1に記載の方法。

3. 反応容器が、厚さ 0.002~0.015 インチの膜を有するチ
ャップのついたチューブであることを特徴とする請求項1に記載の
方法。

4. ビベティングプローブが、筒形の先端を有する細い金属
チューブであることを特徴とする請求項1に記載の方法。

5. さらに、目視検出するために、前記した検出管を自動ビ
ベクタープローブ装置に設置する工程を含み、該装置で検出
し出し工程の終であることを特徴とする請求項1に記載の方
法。

6. 検出装置を増幅するためのキットであって、

a) 本質的に、

一各々、1.6 mM 以上存在する、所望の標的核酸をPCRによ
って増幅するための一組以上のオリゴヌクレオチドプライマ
ー；

一1.0 mM 以上存在する、デオキシヌクレオチド三リン酸 (d
NTPs) の供給；

一熱安定性ポリメラーゼ活性を有する試薬；

一溶液により、界面活性剤および不活性液体核酸；ならびに

一ポリメラーゼ増性の効果をなくするのに十分低い濃度の Mg^{2+}
イオン；

から成る、一つの容器におけるPCR増幅組成物；および

b) Mg^{2+} イオンを、キット取扱説明書に従うサンプルの希釈
および希釈サンプルと増幅組成物との混合により混合液中にポ
リメラーゼ活性の活性化に十分な最終濃度の Mg^{2+} イオンが得
られるような濃度で含む、第二の容器におけるサンプル処理管
液；

を含むキット。

7. 検出装置を増幅するためのキットであって、

a) 本質的に、

一各々、約 1.6 mM 以上存在する、所望の標的核酸をPCRま
たはELCRによって増幅するための少なくとも二対の増幅引
オノヌクレオチドプローブ；

一熱安定性ポリメラーゼ活性を有する試薬；

一溶液により、1.0 mM 以上で存在する、余剰量より少ない
デオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTPs) の供給および熱
安定性ポリメラーゼ活性を有する試薬；

一溶液により、界面活性剤および不活性液体核酸；ならびに

一ポリメラーゼ増性の効果をなくするのに十分低い濃度の Mg^{2+} イ
オン；

から成るPCR増幅組成物；および

b) Mg^{2+} イオンを、キット取扱説明書に従うサンプルの希釈
および希釈サンプルと増幅組成物との混合により混合液中にポ
リメラーゼ活性の活性化に十分な最終濃度の Mg^{2+} イオンが得られ
るような濃度で含む、第二の容器におけるサンプル処理液；
を含むキット。

8. 検出装置アッセイを行うための反応容器装置であって、

一外殻が熱サイクル装置に適合する大きさであり、内部に對し
て開口部を有する熱安定性ポリマー材料のチューブ；

一厚さが 0.0015 インチ以下の穴をあけることができる膜を含
み、その膜によって、チューブを開けることなく自動ビベタ
ーで同じチューブから増幅反応生成物のサンプルを採取する
ことができる、チューブの開口部を完全に閉塞するためのキャ
ップ；および

チューブ；および

一キャップをチューブに対して保持し、キャップを開口部の中
に折り畳むことができる軟質材料；

を含む、反応容器装置。

9. 検出装置アッセイを行うための反応容器装置であって、

一外殻が熱サイクル装置に適合する大きさであり、内部に對し
て開口部を有する熱安定性ポリマー材料のチューブ；

一穴をあけることができる薄い膜を含み、その膜によって、チ
ューブを開けることなく自動ビベターで同じチューブから
増幅反応生成物のサンプルを採取することができる、チューブ
の開口部を完全に閉塞するためのキャップ；および

一キャップをチューブに対して保持し、キャップを開口部の中
に折り畳むことができる軟質折り畳み材料；

を含む、反応容器装置。

10. 折り畳み材料が、さらに、検出材料に刻まれた2割の深
さを含み、g/hの比が約 0.8~20% (ここで、gは二つの層の
中央部分の距離であり、hは、キャップが閉鎖位置にあるとき
に測定したチューブへの付着厚からキャップの上縁までの垂直
部品全体の長さである) であることを特徴とする請求項9に係

係の反応である。

11. δ が 2~2.5 nm であることを特徴とする請求項10に記載の反応装置。